

## GLYCERYL OLIGONUCLEOTIDE

**Patent number:** JP8208687  
**Publication date:** 1996-08-13  
**Inventor:** HOTODA HITOSHI; KOIZUMI MAKOTO; OMINE  
HISANORI; FURUKAWA HIDEHIKO; NISHIGAKI  
TAKASHI; ABE YASUSHI; KANEKO MASAKATSU  
**Applicant:** SANKYO CO LTD  
**Classification:**  
**- International:** C07H21/04  
**- european:**  
**Application number:** JP19950301020 19951120  
**Priority number(s):**

### Abstract of JP8208687

**PURPOSE:** To obtain a new compound, a specific glyceryl oligonucleotide, useful as an anti-HIV agent having excellent anti-HIV activity and improved stability in blood by partially substituting deoxyribose with glycerol.

**CONSTITUTION:** This glyceryl oligonucleotide is shown by formula I [DBB is 3,4-(dibenzyloxy)benzyl; R<1> is guanin-9-yl or adenin-9-yl; R<2> is adenin-9-yl, guanin-9-yl, cytosin-1-yl, thymine-1-yl or uracil-1-yl; (m) is integer of 0 or 1-6; (n) is an integer of 1-6; m+n is 2-10], has excellent anti-HIV activity and improved stability in blood). The compound is obtained by introducing a nucleic acid base into a protected glycerol of formula II, reacting the resultant substance with 4,4'-dimethoxytrityl chloride, reacting the resulting substance with succinic anhydride to give a compound of formula III (R<3> is a nucleic acid base; DMT is 4,4'-dimethoxytrityl), subjecting the compound to extension reaction by phosphoramidite method and deprotecting.

---

BEST AVAILABLE COPY

---

---

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-208687

(43)公開日 平成8年(1996)8月13日

(51)IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 21/04	Z			
// A 6 1 K 31/70	ADY			

審査請求 未請求 請求項の数 4 OL (全 16 頁)

(21)出願番号 特願平7-301020

(22)出願日 平成7年(1995)11月20日

(31)優先権主張番号 特願平6-291207

(32)優先日 平6(1994)11月25日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 穂戸田 仁

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 小泉 誠

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 大峰 寿典

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株  
式会社内

(74)代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリセリルオリゴヌクレオチド

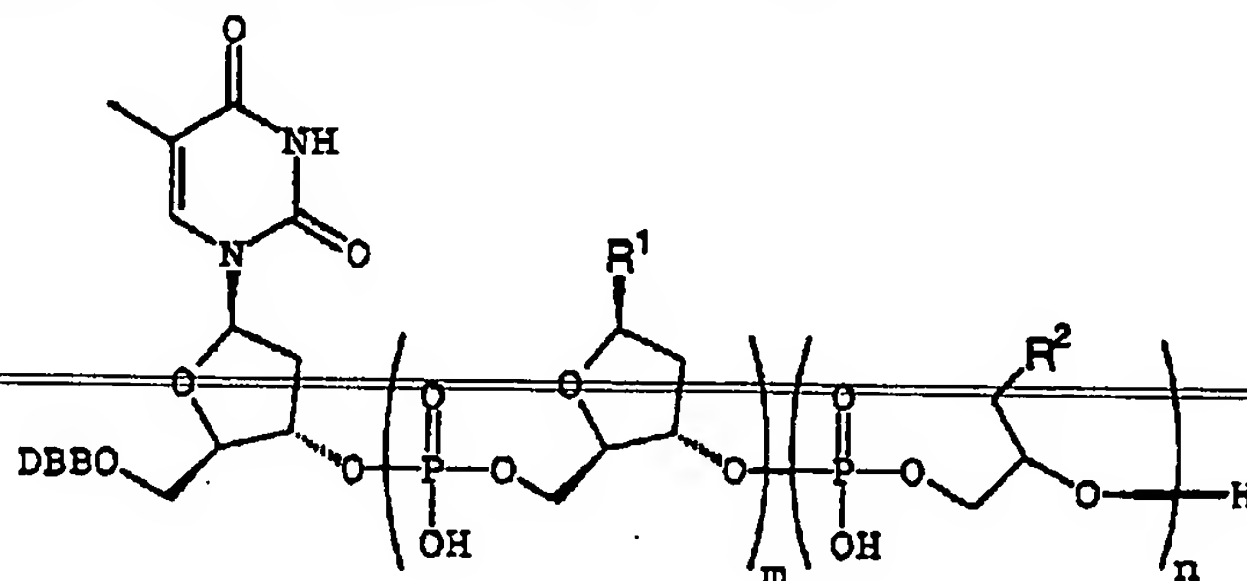
(57) 【要約】

\* 目的とする。

【課題】本発明は、優れた抗HIV活性を有し、しかも、優れた安定性も有する抗HIV剤を提供することを\*

【解決手段】一般式

【化1】



(1)

〔式中、DBBは3、4-（ジベンジルオキシ）ベンジル基；R<sup>1</sup> はグアニル又はアデニル基；R<sup>2</sup> はアデニル、グアニル、シトシル、チミシル又はウラシル基；

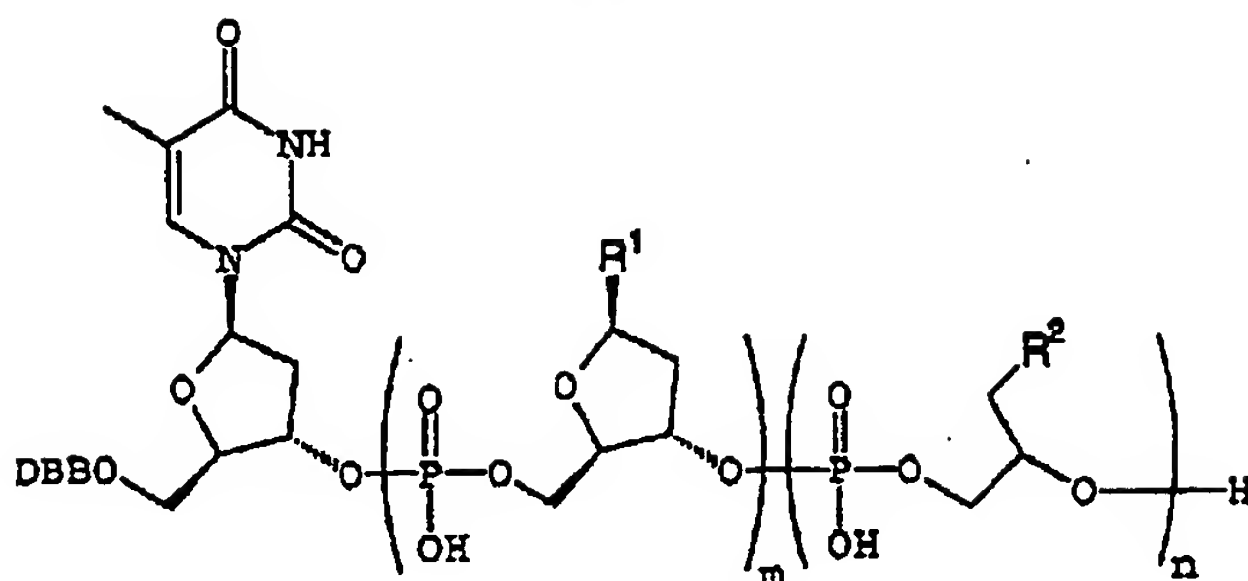
mは0又は1乃至6；nは1乃至6。但し、m及びnの和は2乃至10] で表される化合物及びその塩。

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式

\*【化1】

\*



(1)

【式中、DBBは3、4-(ジベンジルオキシ)ベンジル基を示し、R<sup>1</sup>はそれぞれ独立にグアニン-9-イル又はアデニン-9-イル基を示し、R<sup>2</sup>はそれぞれ独立にアデニン-9-イル、グアニン-9-イル、シトシン-1-イル、チミン-1-イル又はウラシル-1-イル基を示し、mは0又は1乃至6の整数を示し、nは1乃至6の整数を示す。但し、m及びnの和は2乃至10である。】で表される化合物及びその塩。

【請求項2】請求項1において、R<sup>2</sup>がグアニン-1-イル基である化合物及びその塩。

【請求項3】請求項1において、m及びnの和が5であり、塩基配列がTGGGGG又はTGGGAGである化合物及びその塩。

【請求項4】請求項1において、m及びnの和が6であり、塩基配列がTGGGAGGである化合物及びその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗HIV活性を有するオリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体で、一部のデオキシリボースをグリセロールに置き換え、血中安定性を向上させた、グリセリルオリゴヌクレオチド誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、オリゴヌクレオチド誘導体が、種々の生物活性を示すことがわかってきた。例えば、Calabrettaらは、慢性骨髄性白血病に対する18量体のアンチセンスオリゴヌクレオチドを報告した(B. Calabretta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2351-2355(1991))。また、Griffinらは、15量体のオリゴヌクレオチドがトロンビン阻害剤として作用することを報告した(L. C. Griffin et al, Gene, 137, 25-31(1994))。しかし、これらのオリゴヌクレオチド誘導体は天然型の構造であり、天然型のオリゴヌクレオチドは、血中での分解

手段として、リン酸ジエステル結合をチオエートに変換する方法が知られている。例えば、Agrawalらは、抗HIV-1活性を有するホスホロチオエート型の25量体のオリゴヌクレオチドを報告した(A. Agrawal et al, Clin. Res., 42, 282A(1994))。しかし、ホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチドは非常に多くのジアステレオマーの混合物となり、単一の化合物を得ることが困難であった。

【0004】一方、本発明者らは、5'-末端が修飾された短鎖のオリゴヌクレオチドが、抗HIV-1活性を示すことを報告した(特開平5-138517号)。

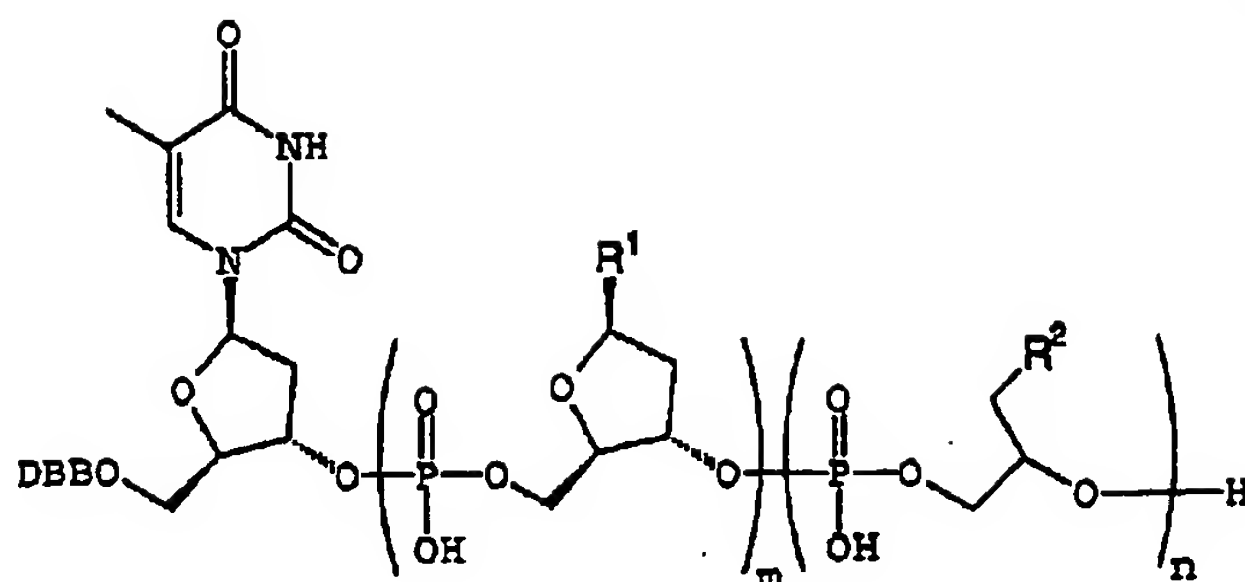
【0005】

【発明が解決しようとする課題】生理活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体として、オリゴヌクレオチド部分が天然型の化合物は、血中安定性が低いことが知られている。また、血中安定性を向上させるために、オリゴヌクレオチド部分をホスホロチオエート型にした化合物は非常に多くのジアステレオマーの混合物になってしまう。従って、オリゴヌクレオチド部分がジアステレオマーの混合物とならない形で修飾することにより、血中安定性が向上するような、生理活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体の開発が望まれている。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、抗HIV-1活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体のリボース部分をグリセロールに置き換えた化合物が血中のヌクレアーゼによる分解に対して非常に安定で、ジアステレオマーの混合物とならず、強い抗HIV-1活性を有することを見出した。また、これらのオリゴヌクレオチド誘導体の合成にあたっては、グリセリルヌクレオシドホスホロアミダイト中間体が有用であることを見出した。

【0007】本発明のグリセリルオリゴヌクレオチドは、一般式



(1)

【0009】〔式中、DBBは3、4-（ジベンジルオキシ）ベンジル基を示し、 $R^1$  はグアニン-9-イル又はアデニン-9-イル基を示し、 $R^2$  はアデニン-9-イル、グアニン-9-イル、シトシン-1-イル、チミン-1-イル又はウラシル-1-イル基を示し、 $m$ は0又は1乃至6の整数を示し、 $n$ は1乃至6の整数を示す。但し、 $m$ 及び $n$ の和は2乃至10である。〕で表される化合物及びその塩である。

【0010】一般式（1）において、 $R^2$  は好適にはグアニン-9-イル基であり、 $m$ 及び $n$ の和は好適には5、6又は7であり、さらに好適には5又は6である。

【0011】また、 $R^3$  の「イミド基に保護基を有していてもよいチミン-1-イル若しくはウラシル-1-イル基」の保護基としては、アシル型の保護基であれば特に限定はないが、好適にはベンゾイル基又はアニソイル基である。

【0012】一般式（1）の化合物のうち、好適な化合物としては、下記の〔A群〕に示す塩基配列をもつ化合物

物あげられ、さらに好適には〔B群〕に示す塩基配列をもつ化合物があげられる。なお、Tはチミン残基を、Gはグアニン残基を、Aはアデニン残基を示す。

【0013】〔A群〕TGGGGG、TGGGAG、TGGGAGG、TGGGGGG、TGGGGAG、TGGGGTG、TGGGGGTG、TGGGGCG、TGGGGUG、TGGGAGGG、TGGGAGTG、TGGGTGGG、TGGGGTGGG、TGGGGTTGGG、TGGGAGG、TGGGGAAGG、TGGGGTTGGTG、TGGGGTTGGGG。

〔B群〕TGGGGG、TGGGAG、TGGGAGG。

【0014】

【発明の実施の形態】

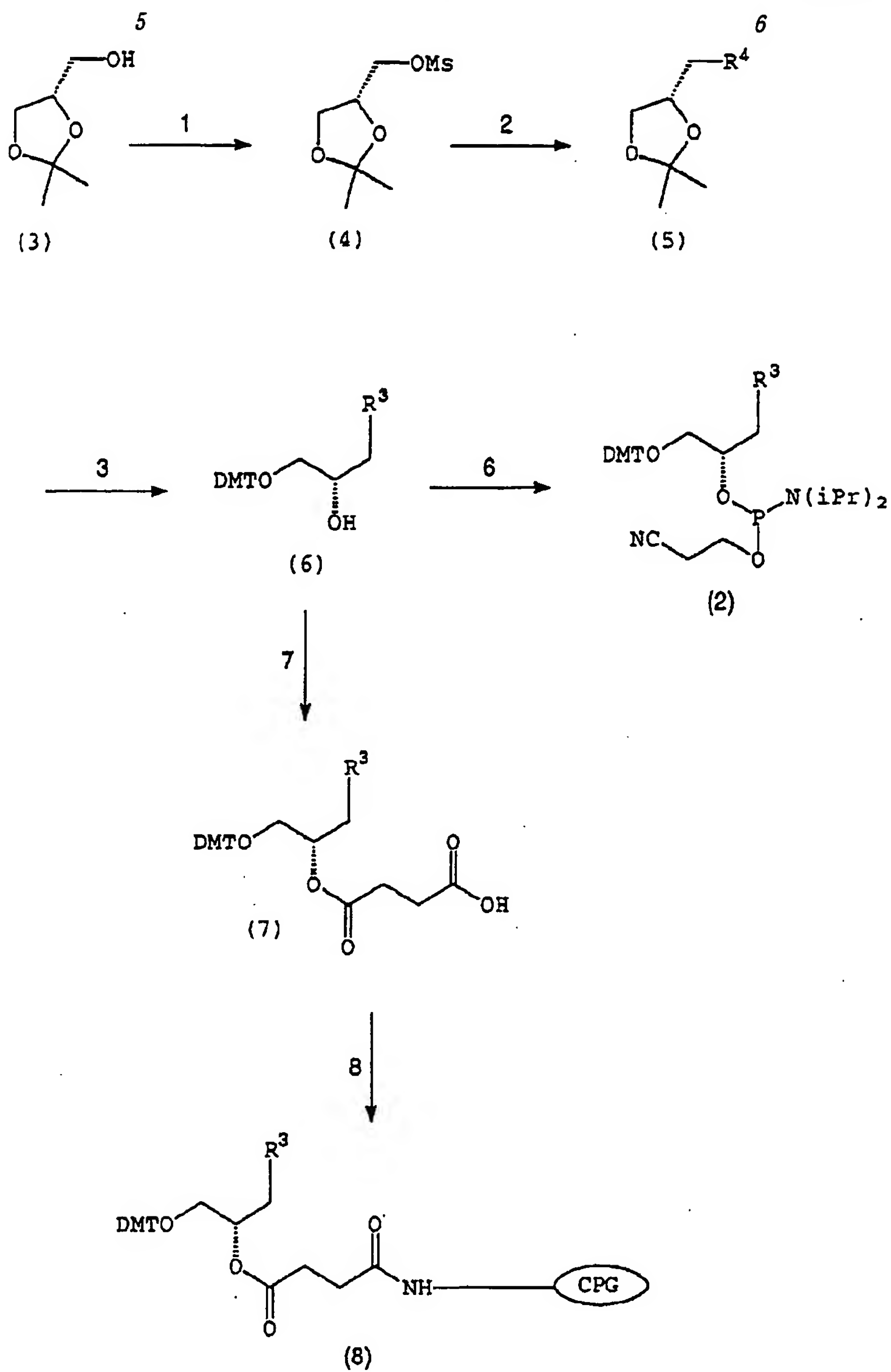
（製造方法）次に本発明のグリセリルオリゴヌクレオシチドの製造方法について説明する。

【0015】

【化3】

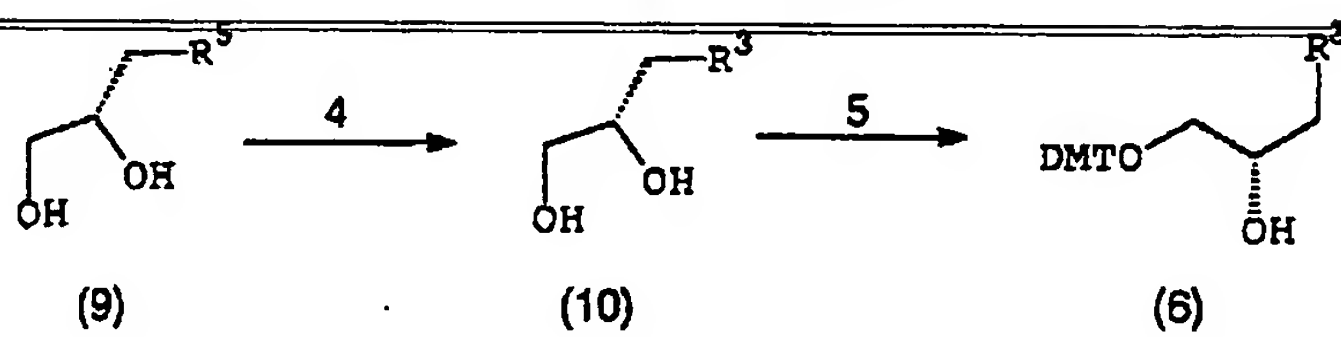
(4)

特開平8-208687



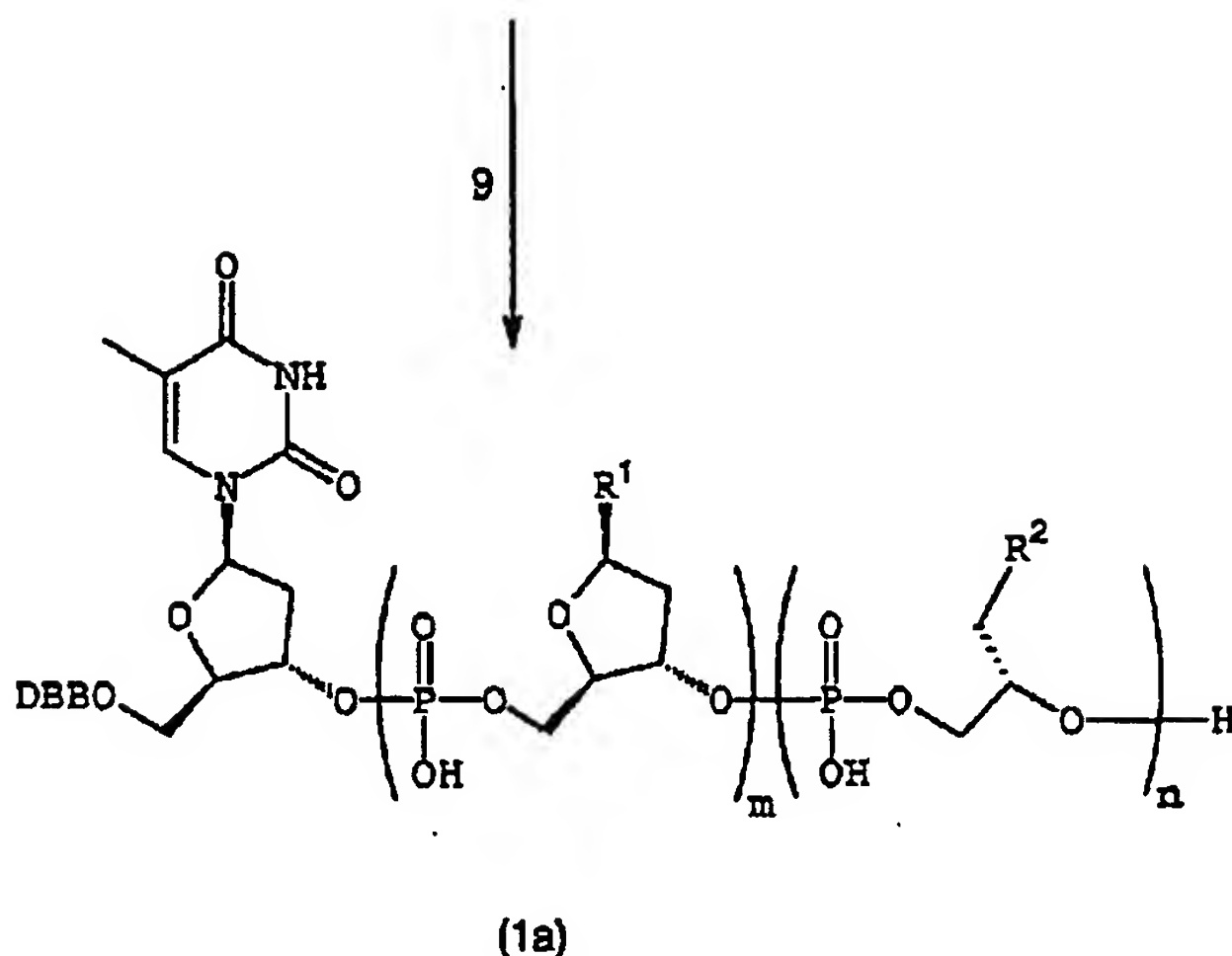
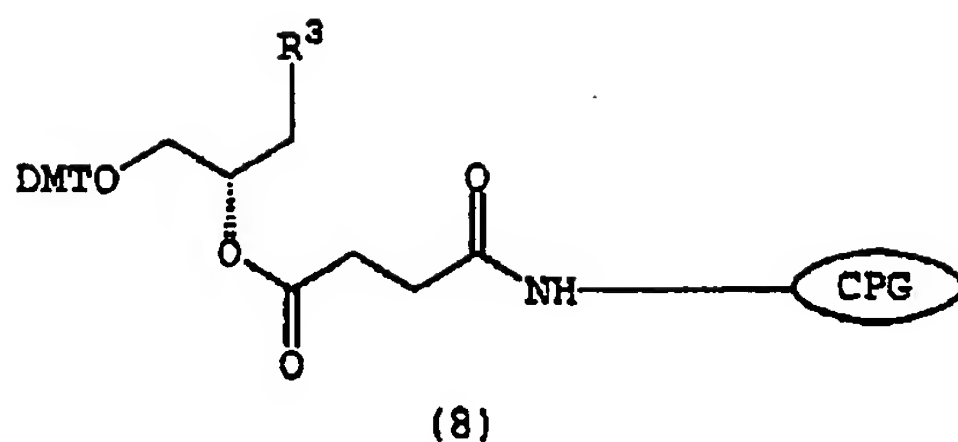
【0016】

\* \* 【化4】



【0017】

【化5】



【0018】工程表中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $m$ 及び $n$ は前述のものを示し、 $R^4$ は2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基を示し、 $R^5$ はアデニン-9-イル、シトシン-1-イル、チミン-1-イル又はウラシル-1-イル基を示し、 $Ms$ はメタンスルホニル基を示し、 $iPr$ はイソプロピル基を示し、 $DMT$ は4、4'-ジメトキシトリチル基を示し、 $CPG$ はコントロールドポアグラスを示す。

【0019】以下に、各工程について、詳しく説明する。

#### 【0020】(第1工程) メシル化

本工程は、不活性溶剤中、化合物(3)に、塩基の存在下、メタンスルホニルクロリドを反応させて、化合物(4)を得る工程である。

【0021】使用される溶剤としては、反応を阻害せず、原料化合物をある程度溶解するものであれば特に限定はないが、好適には、メチレンクロリド、クロロホルム、ジクロロエタンのようなハロゲン化炭化水素類(特にメチレンクロリド)である。使用される塩基としては、トリエチルアミン、ピリジン等の有機アミン(特にトリエチルアミン)があげられる。

【0022】反応温度及び反応時間は、原料、試薬により異なるが、0乃至40℃で、30分乃至5時間である。

【0023】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

グネシウムで乾燥する。乾燥剤を濾去し、減圧下、溶剤を留去することにより得ることができる。

【0025】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0026】(第2工程) 2-アミノ-6-クロロプリンの導入

30 本工程は、不活性溶剤中、化合物(4)に、塩基の存在下、2-アミノ-6-クロロプリンを反応させて、化合物(5)を得る工程である。

【0027】使用される溶剤としては、反応を阻害せず、原料化合物をある程度溶解するものであれば特に限定はないが、好適には、ジメチルホルムアミドである。

【0028】使用される塩基は、好適には、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムのようなアルカリ金属炭酸塩である。

【0029】反応温度及び反応時間は、原料、試薬により異なるが、50乃至150℃で、10乃至48時間である。

【0030】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0031】例えば、溶剤を減圧下留去し、残渣に酢酸エチルを加えて溶解し、飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を減圧下留去することにより得ることができる。

【0032】得られた目的化合物は必要ならば、常法、



【0033】(第3工程) クロルの加水分解、アミノ基の保護、ジメトキシトリチル化

本工程は、連続する3工程からなる。

3 a) 不活性溶剤中、化合物(5)に、希塩酸等の無機酸を加え、80乃至150℃で、30分乃至2時間、反応させる。終了後、氷冷下、水酸化ナトリウム水溶液で中和し、溶剤を減圧下留去する。残渣をピリジンを用いて、3回共沸して乾燥させ、そのまま、次工程に用いる。

【0034】3 b) 3 aで得られる化合物を無水ピリジンに懸濁させて、-20乃至5℃で攪拌しながら、トリメチルシリルクロリド(TMSCl)を滴下する。滴下が終了してから30分後に無水イソブチリル酸を加え、10乃至40℃で、30分乃至4時間攪拌する。その後、-20乃至5℃で、水を加え、さらに10乃至30分間攪拌し、濃アンモニア水を加えて30分乃至2時間攪拌する。

【0035】反応終了後、溶剤を減圧下に留去し、水を加えて溶解後、エーテル等の水と混和しない溶剤で洗浄する。水を減圧下に留去し、ピリジンを用いて共沸により乾燥して、目的化合物を得ることができる。

【0036】通常、目的化合物は、精製せずに次の工程に用いる。

【0037】3 c) 3 bで得られる化合物を無水ピリジンに溶解し、4、4'-ジメトキシトリチルクロリドを加え、10乃至40℃で、1乃至10時間攪拌する。反応終了後、塩化メチレンで希釈し、飽和重曹水で洗浄する。有機層を乾燥剤で乾燥後、溶剤を留去し、残渣をクロマトグラフィーにて精製して、目的化合物を得ることができる。

【0038】(第4工程) TMS化、ベンゾイル化、加水分解

本工程は、化合物(9)を原料として、化合物(10)を得る工程である。

【0039】本工程は、連続した3工程からなる。

【0040】4 a) ピリジン中、化合物(9)に、トリメチルシリルクロリドを反応させ、10乃至40℃で、30分乃至2時間攪拌する。

【0041】4 b) 終了後、反応液へ、ベンゾイルクロリドを加え、10乃至40℃で、30分乃至5時間攪拌する。

【0042】4 c) 終了後、反応液へ水を加え、10乃至40℃で、5分乃至2時間攪拌する。

【0043】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0044】例えば、溶剤を減圧下留去し、残渣に塩化メチレンを加えて溶解し、飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を減圧下留去することに

例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0046】(第5工程) ジメトキシトリチル化

本工程は、ピリジン中、化合物(10)に、ジメトキシトリチルクロリドを反応させて、化合物(6)を得る工程である。

【0047】反応温度及び反応時間は、原料、試薬により異なるが、10乃至40℃で、3乃至12時間である。

【0048】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0049】例えば、溶剤を減圧下留去し、残渣に塩化メチレンを加えて溶解し、飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を減圧下留去することにより得ることができる。

【0050】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0051】(第6工程) 3価のリンの導入

本工程は、塩化メチレン中、化合物(6)に、1H-テトラゾールジイソプロピルアミン塩の存在下、2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを反応させて、本発明の目的中間体(2)を得る工程である。

【0052】反応温度及び反応時間は、原料により異なるが、0乃至40℃で、10分乃至48時間である。

【0053】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0054】例えば、溶媒を減圧下留去し、水と混和しない溶剤、例えば酢酸エチルを加え、残さを溶解し、氷冷した炭酸ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、減圧下、溶剤を留去することにより得ることができる。

【0055】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0056】(第7工程) コハク酸残基の導入

本工程は、ピリジン中、化合物(6)に、ジメチルアミノピリジンの存在下、無水コハク酸を反応させて、化合物(7)を得る工程である。

【0057】反応温度及び反応時間は、原料により異なるが、0乃至40℃で、10乃至48時間である。

【0058】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0059】例えば、溶媒を減圧下留去し、水と混和しない溶剤、例えば酢酸エチルを加え、残さを溶解し、10%クエン酸水溶液及び水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、減圧下、溶剤を留去

例えば再結晶（特にアセトニトリルを用いて）等によって更に精製できる。

#### 【0061】（第8工程）CPGとの結合

本工程は、化合物（7）を原料として、化合物（8）を得る工程である。

【0062】本工程は、連続した3工程からなる。

【0063】8a) 化合物（7）を、テトラヒドロフランとピリジンに溶解し、ペンタクロロフェノール及びジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を加え、-20乃至5℃で30分乃至2時間攪拌した後に、10乃至40℃で12乃至24時間攪拌する。反応終了後、不溶物を濾過して除き、溶剤を減圧下に留去する。

【0064】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えばクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0065】8b) 8aで得られたら化合物を、ピリジンを用いて共沸して乾燥させた後に、ジメチルホルムアミド（DMF）に溶解し、アミノプロピルCPG（CPG INC. ; AMP00500B ; 521A ; 120/200 ; 85.7  $\mu\text{mol/g}$ ）及びトリエチルアミンを加え、10乃至40℃で10乃至24時間放置する。得られる不溶物を濾過して集め、DMF及び塩化メチレンで洗浄する。

【0066】8c) 8bで得られる化合物に無水酢酸とピリジンを加え、ジメチルアミノピリジンを加え、10乃至40℃で1時間放置する。得られる不溶物を濾過して集め、ピリジンと塩化メチレンで洗浄し、乾燥させることにより、目的化合物（8）を得ることができる。

【0067】（第9工程）伸長反応、脱保護、脱CPG  
本工程は、通常のDNA合成機を用いた通常のオリゴデオキシヌクレオチドの合成に準じて行うことができる。

【0068】例えば、バイオサーチ（日本ミリポア・リミテッド）のCyclone™ Plus DNA/RNAシンセサイザーに、プログラムとしてアミダイトカートリッジを用いて伸長反応を行っていく。

【0069】この際、所望に応じ使用する各ユニット試薬としては、通常のアデニン及びグアニンに対応する $\beta$ -シアノエチルアミダイト溶液（35mMアセトニトリル溶液）、5'-O-（3,4-ジベンジルオキシベン\*

\*ジル）チミジン-3'-O-（2-シアノエチル N, N-ジイソプロピル）ホスホロアミダイト（穂戸田ら、Nucleosides & Nucleotides, 13, 1375-1395 (1994)）のアセトニトリル溶液（35mM）、所望の化合物（2）のアセトニトリル溶液（35mM）である。

【0070】固相担体としては、5  $\mu\text{mol}$  の化合物（8）を用いる。

【0071】最後のユニットを縮合した後には酸処理を行わない設定にしておき、コントロールドポアグラス（CPG）上に、保護されたオリゴヌクレオチドが構築された誘導体を得ることができる。これを減圧下乾燥し、カラムからとり出し、濃アンモニア水にひたして密閉し、10乃至40℃で2日間反応する。切断されたCPGを濾過により除き、水で洗浄し、ろ液と洗浄液を合わせて、ジエチルエーテルで洗浄し、減圧下にアンモニアとジエチルエーテルを除いた後、水溶液を濃縮する。これをミリポアフィルターで濾過した後に、逆相HPLC（Inertsil PREP-ODS, 20 $\times$ 250mm ; 0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液（TEAA）, pH7 ; 25 $\rightarrow$ 55% CH<sub>3</sub>CN / 30min, linear gradient ; 7mL/min ; 254nm）にアプライし、16.9分に溶出する画分を集める。減圧下、アセトニトリルを留去し、凍結乾燥することにより本発明の目的化合物（1）を得ることができる。

【0072】化合物（3）又は（9）の光学活性体を用いることにより、所望の逆配位の本発明の化合物（1）を同様にして製造することができる。化合物（3）の光学活性体は、市販のものを用いることができる。化合物（9）の光学活性体は、公知の方法により製造することができる（A.Holy, Collection Czechoslov.Chem.Comm., 40,187(1975).）。

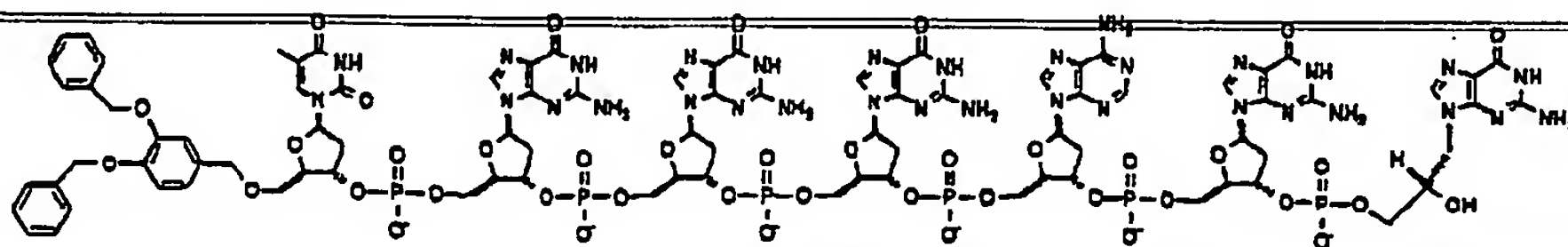
【0073】

【実施例】

（実施例1）

【0074】

【化6】



【0075】（1a）（R）-（2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イル）メチルメタンスルホネート

1.32g（10mmol）の（S）-（+）-（2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イル）メタ

チレンに溶解し、0℃にて攪拌した。ここに、2.12mL（15.2mmol）のトリエチルアミンを加え、0.854mL（11mmol）のメシルクロリドを滴下して加えた。1時間後に50mLの水を加え、さらに10分間攪拌した。有機層を分取し、50mLづつの飽



標記目的化合物 (o i l) を得た。

【0076】<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 4.38 (m, 1H); 4.22(d, 2H, J=5.28Hz); 4.11 (dd, 1H, J=6.60, 8.58Hz); 3.83(dd, 1H, J=5.94, 8.58Hz); 3.06(s, 3H); 1.45 (s, 3H); 1.37(s, 3H).

(1 b) 2-アミノ-6-クロロ-9-[(2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキサラン-4-イル) メチル] プリン

(1 a) で得られた化合物 1.051 g (5 mmol) を 90 mL のジメチルホルムアミド (DMF) に溶かし、1.059 g (6.25 mmol) の 2-アミノ-6-クロロプリンと 0.888 g (6.43 mmol) の K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加え、90℃にて一夜攪拌した。溶媒を減圧下留去した後に、100 mL の酢酸エチルに溶解し、100 mL の飽和重曹水で洗浄した。水層を 100 mL の酢酸エチルで 2 回抽出し、前の有機層と合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去した後に、100 g (230-400 mesh) のシリカゲルカラムにアプライし、2乃至3%メタノール-塩化メチレンで溶出して、0.9622 g (68%) の標記目的化合物を得た。

【0077】<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm : 8.08(s, 1H); 6.92(s, 2H); 4.52-4.43(m, 1H); 4.20-4.10 (m, 2H); 4.01(dd, 1H, J=6.60, 8.57Hz); 3.77(dd, 1H, J=5.28, 8.57Hz); 1.29(s, 3H); 1.24(s, 3H).

MASS : 283

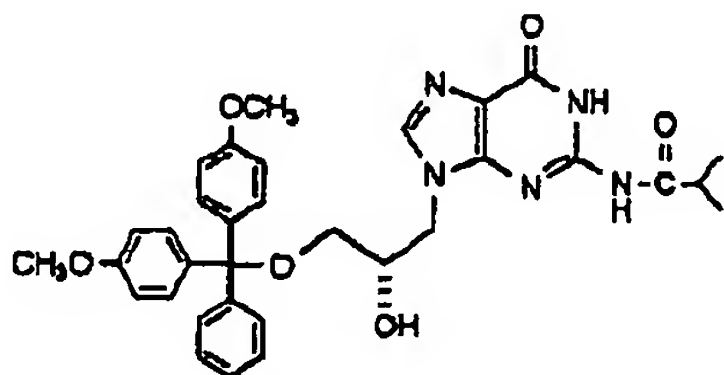
IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3430, 3312, 3186, 2984, 2941, 2860, 1642, 1616, 1560, 1517, 1429.

UV (MeOH) ε : 223(22300), 248(4800), 310(6000).

(1 c)

【0078】

【化7】



【0079】(1 b) で得られた化合物 925 mg (3.26 mmol) に 2.75 mL の水と 0.55 mL の 12N-HCl を加え、75分間加熱還流した。反応容器を氷水浴にて冷却しながら、約 2.6 mL の 2.5N-NaOH にて中和した。溶媒を減圧下留去した後に、ピリジンで 3 回共沸して乾燥させた。33 mL の乾燥ピリジンに懸濁させて、反応容器を氷水浴にて冷却しながら攪拌し、2.1 mL の TMSCl を滴下して加えた。30分後に 2.8 mL の無水イソブチリル酸を加え、室温にもどして 2 時間攪拌した。反応容器を氷水浴

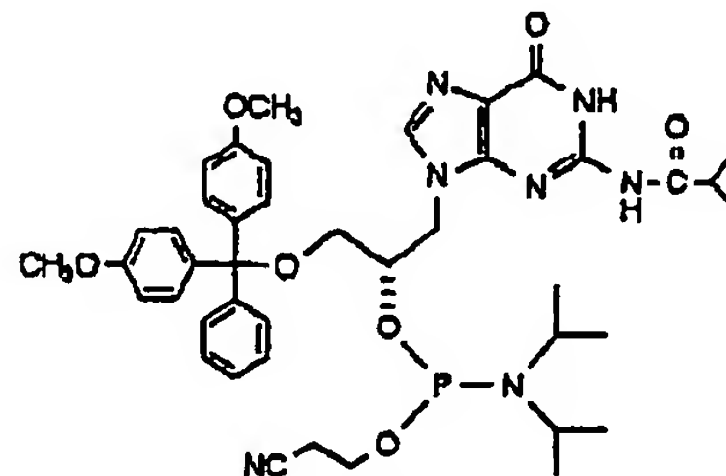
間攪拌した。溶媒を減圧下に留去し、100 mL の水に溶かした後に、100 mL のエーテルで洗浄した。溶媒を減圧下に留去した後に、ピリジンで 2 回共沸して乾燥させた。33 mL の乾燥ピリジンに溶かし、1.267 g (3.26 mmol) のジメトキシトリチルクロリドを加えて攪拌した。3時間後に 200 mg のジメトキシトリチルクロリドを追加し、さらに 2 時間攪拌した。200 mL の塩化メチレンで希釈して、100 mL の飽和重曹水で 3 回洗浄した後に、無水硫酸マグネシウムにて乾燥させた。溶媒を留去した後に、100 g (70-230 mesh) のシリカゲルカラムにアプライし、1-4%メタノールを含む塩化メチレンにて溶出し、標記目的化合物を 924.7 mg (47%) 得た。

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 11.81(s, 1H); 8.55 (s, 1H); 7.54(s, 1H); 7.47-6.81(m, 13H); 4.90(brs, 1H); 4.40-3.98(m, 3H); 3.79(s, 6H); 3.35-3.20(m, 2H); 2.70-2.55(m, 1H); 1.27-1.22(m, 6H).

(1 d)

【0080】

【化8】



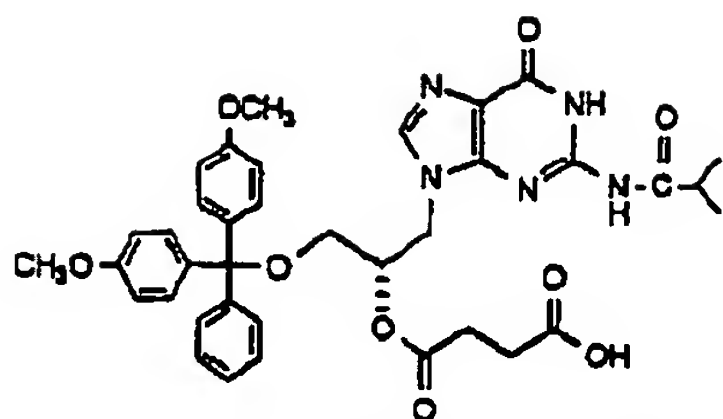
【0081】(1 c) で得られた化合物 690 mg (1.15 mmol) をピリジンで 1 回共沸して乾燥させた後に 6 mL の塩化メチレンに溶かし、98.8 mg (0.577 mmol) の 1H-テトラゾールジイソプロピルアミン塩と 404 μL (1.27 mmol) の 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを加え、室温で 7 時間 20 分攪拌した。100 μL の 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトと 10 mg の 1H-テトラゾールジイソプロピルアミン塩を追加して、さらに室温で 14 時間攪拌した。溶媒を

留去した後に、50 mL の酢酸エチルに溶かし、50 mL の氷冷した 10%炭酸ナトリウム水で 2 回洗浄し、50 mL の飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を留去し、40 g (70-230 mesh) のシリカゲルカラムにアプライし、酢酸エチルで溶出して標記目的化合物を 806.5 mg (88%) 得た。

【0082】<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, CDCl<sub>3</sub>, mixture of diastereomers) δ ppm: 11.90, 11.85(2s, 1H); 8.65, 8.31 (2s, 1H); 7.54, 7.49(2s, 1H); 7.45-6.79(m, 13H); 4.50 (brs, 1H); 4.33 (d, 2H, J=5.93Hz); 3.79(s, 6H); 3.70-

15

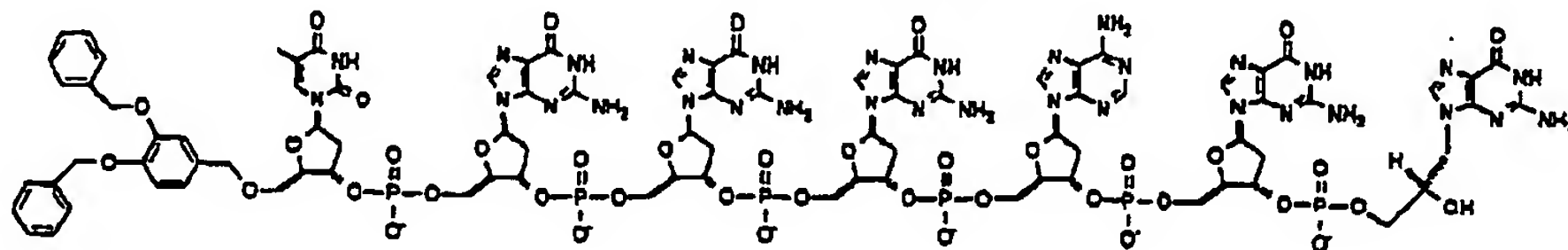
(1 e)  
[0083]  
[化9]



【0084】(1 d) で得られた化合物 179 mg (0.3 mmol) をピリジンで1回共沸して乾燥させた後に、4.5 mL の乾燥ピリジンに溶かし、12 mg (0.1 mmol) のジメチルアミノピリジン (DMA P) と 30 mg (0.3 mmol) の無水コハク酸を加え、室温で攪拌した。3時間後に12 mg の DMA P を追加し、さらに15時間30分後に41  $\mu$ L (0.3 mmol) のトリエチルアミンを加えた。さらに90分後に30 mg の無水コハク酸を加え、さらに2時間30分後に60 mg の無水コハク酸を加え、さらに2時間後に60 mg の無水コハク酸を加えて、さらに16時間30分攪拌した。溶媒を減圧下に留去して、20 mL の酢酸エチルに溶かし、20 mL の10%クエン酸水溶液で2回洗浄し、20 mL の水で1回洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後に、溶媒を減圧下に留去して、アセトニトリルから再結晶して、若干無水コハク酸を含む標記目的化合物を151.8 mg (72.5%) 得た。

【0085】 $^1\text{H-NMR}$  (270MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.49(s, 1H); 7.56(s, 1H); 5.22(brs, 1H); 4.52-4.30(m, 2H); 3.79(s, 6H); 3.27-2.40(m, 7H); 1.17(d, 6H,  $J=7.26\text{Hz}$ ).

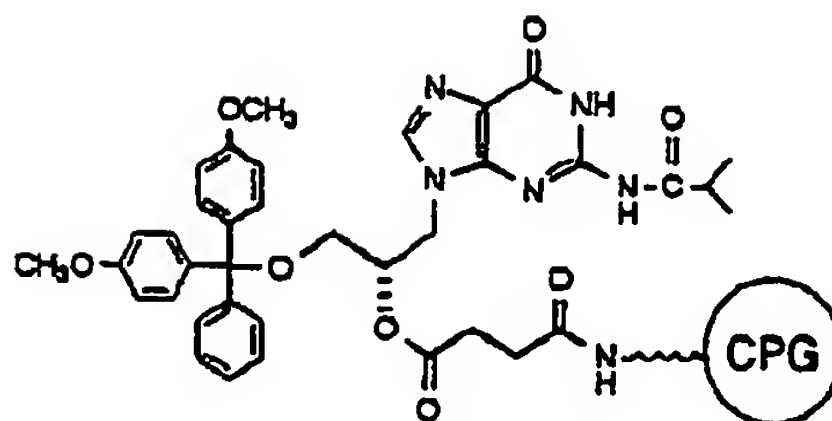
(1 f)  
[0086]  
[化10]



【0090】ミリジェン/バイオサーチ (日本ミリポア・リミテッド) の CycloneTM Plus DNA/RNA シンセサイザーに、付属する合成用試薬類と、プログラムとして15.0  $\mu\text{mol}$  e アミダイトカートリッジを接続した。ただしこのとき、チミジンに対応する  $\beta$ -シアノエチルアミダイト溶液のかわりに、35 mM に調製した 5'-O-(3,4-ジベンジルオキシベンジル) チミジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト (穂戸田ら, Nucleosides & Nucleotide

16

\*



【0087】(1 e) で得られた化合物 151.8 mg (0.217 mmol) をピリジンで2回共沸して乾燥させた後に、2 mL のテトラヒドロフランと50  $\mu$ L のピリジンに溶かし、58 mg (0.217 mmol) のペンタクロロフェノールと113 mg (0.55 mmol) の DCC を加え、氷水浴中で攪拌した。1時間後に室温にもどし、さらに16時間攪拌した。不溶物を濾過して除き、溶媒を減圧下に留去し、10 g (70-230 mesh) のシリカゲルカラムにアプライし、3%メタノールを含む塩化メチレンで溶出することにより239.4 mg の若干ジシクロヘキシルウレアを含む活性エステル誘導体を得た。これをピリジンで2回共沸して乾燥させた後に、1.2 g のアミノプロピル CPG (CPG INC.; AMP00500B; 521A; 120/200; 85.7  $\mu\text{mol/g}$ ) と5 mL の DMF と28  $\mu$ L (0.2 mmol) のトリエチルアミンを加え、室温で放置した。19時間後に不溶物を濾過して集め、DMF と塩化メチレンで洗浄した。9 mL のピリジンと1 mL の無水酢酸と122 mg (1 mmol) のジメチルアミノピリジンを加え、室温で放置した。1時間後に不溶物を濾過して集め、ピリジンと塩化メチレンで洗浄し、乾燥させて、目的とする標記目的化合物を得た。グリセリルグアニン導入量をジメトキシトリチル基で定量したところ、46.7  $\mu\text{mol/g}$  であった。

【0088】(1 g)

【0089】

【化11】

シアノエチルアミダイト溶液のかわりに、35 mM に調製した (1 d) で得られた化合物のアセトニトリル溶液を用いた。固相担体として5  $\mu\text{mol}$  分のグリセリルグアニン誘導体が結合した、(1 f) で得られた化合物を用い、プログラムに TGGGAGC という塩基配列を入力し、最後の T を縮合した後には酸処理を行わない設定のプログラムを作動させることにより、コントロールドポアグラス (CPG) 上に、保護されたオリゴヌクレオチドが構築された誘導体を得た。これを減圧下乾燥したのちにカラムからとり出し、10 mL の濃アンモニア

洗浄液を合わせて、30mLずつのジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧下にアンモニアとジエチルエーテルを除き、水溶液を約3mLまで濃縮した。これを0.45ミクロンのミリポアフィルターで濾過した後に、逆相HPLC (Inertsil PREP-ODS, 20×250mm; 0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液 (TEAA), pH7; 25→55% CH<sub>3</sub>CN/30min, linear gradient; 7mL/min; 254nm) に、3回に分けてアプライし、16. \*

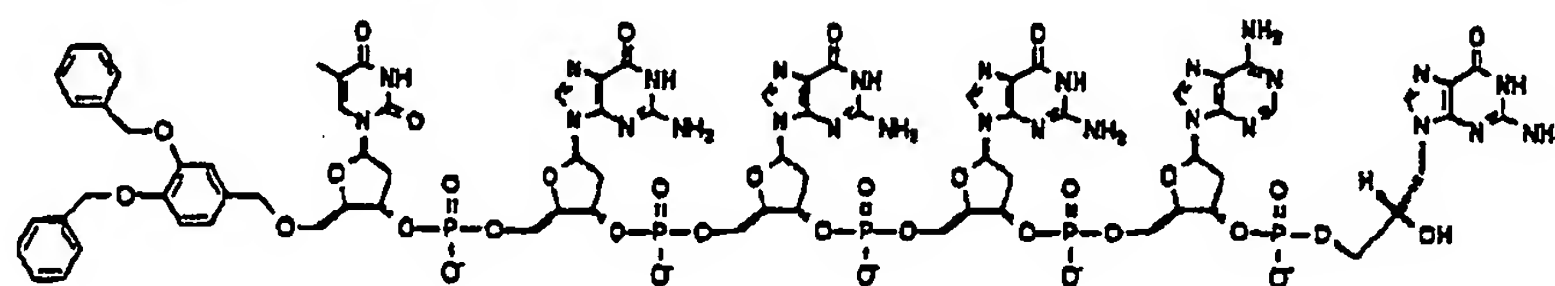
\* 9分に溶出する画分を集めた。減圧下にアセトニトリルを留去したのちに凍結乾燥し、50mLの水にとかしてから再度凍結乾燥して、アモルファス状の標記目的化合物を85units (A260) 得た。

【0091】UVmax: 254nm

(実施例2)

【0092】

【化12】



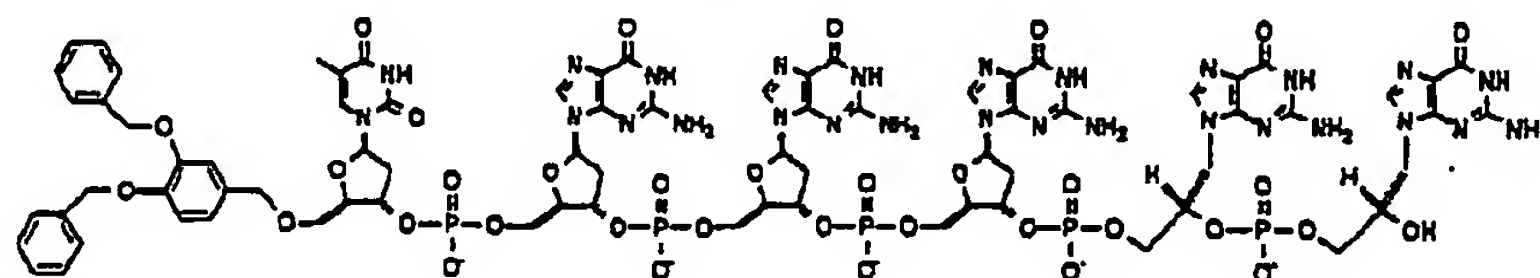
【0093】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGACという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を124units (A260) 得た。

※ 【0094】UVmax: 255nm

(実施例3)

【0095】

【化13】



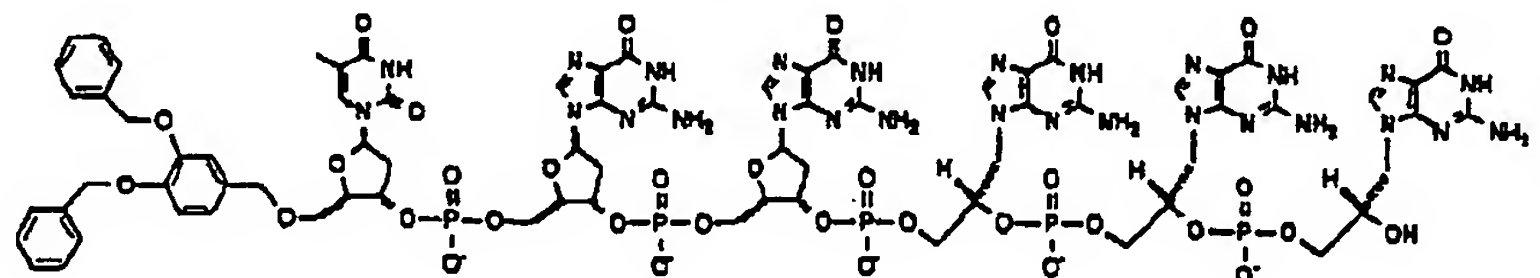
【0096】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を48units (A260) 得た。

★ 【0097】UVmax: 253nm

(実施例4)

【0098】

【化14】



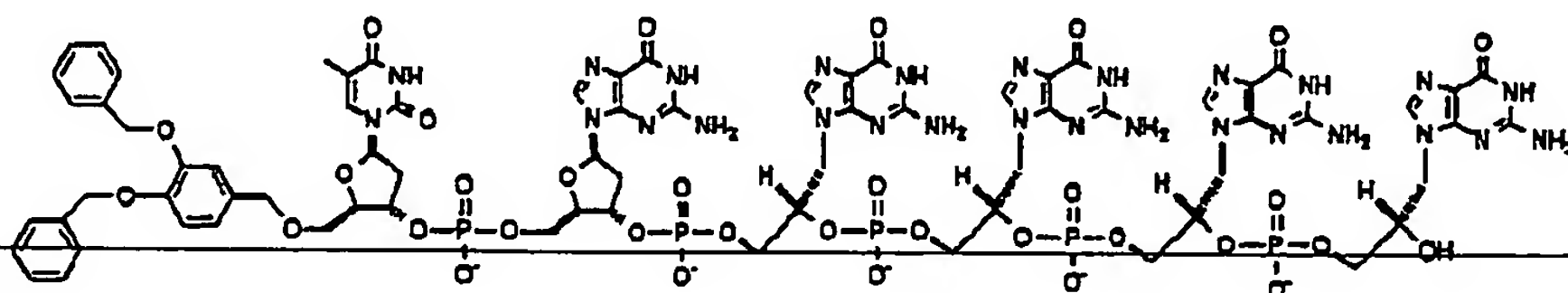
【0099】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGCCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を74units (A260) 得た。

☆ 【0100】UVmax: 253nm

(実施例5)

【0101】

【化15】



【0102】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGCCCCという塩基配列を入力した。その結果、

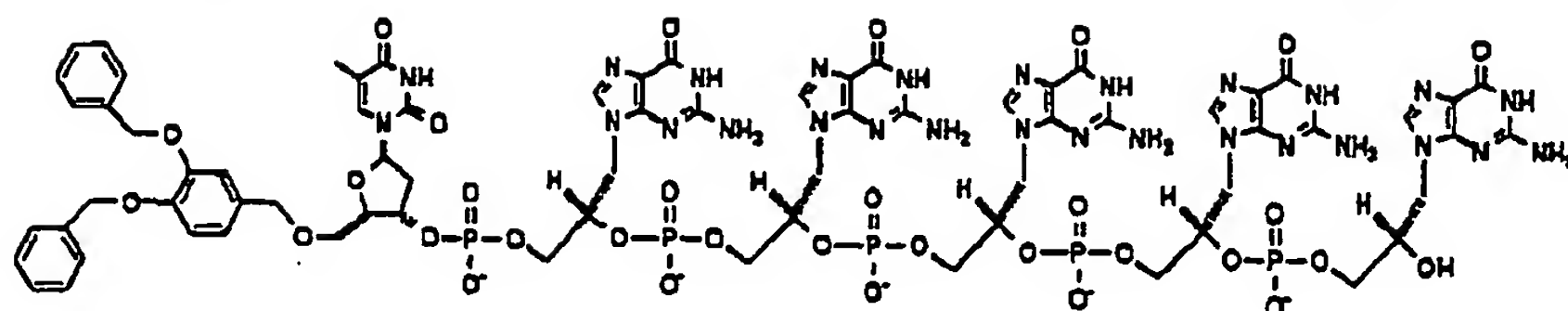
【0103】UVmax: 253nm

(実施例6)

【0104】

19

20



【0105】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTCCCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を75units (A 260) 得た。

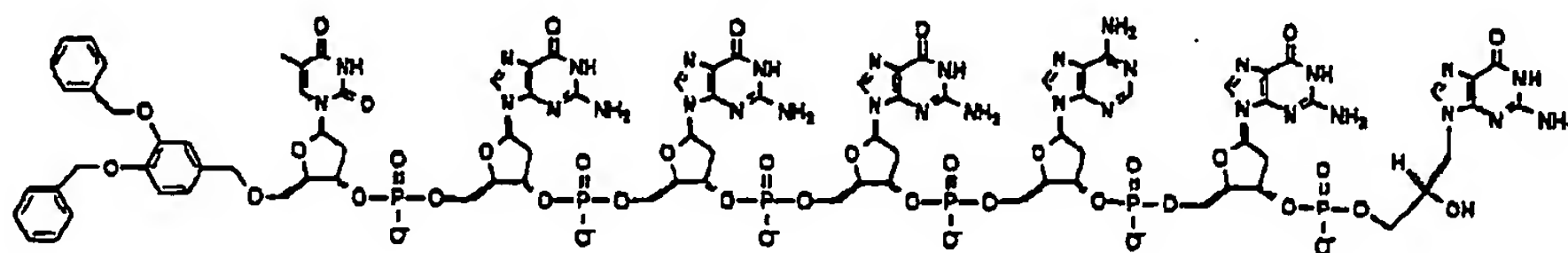
\* 【0106】UVmax: 253nm

(実施例7)

【0107】

【化17】

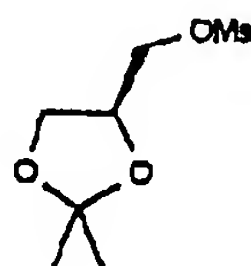
\*



【0108】(7a)

【0109】

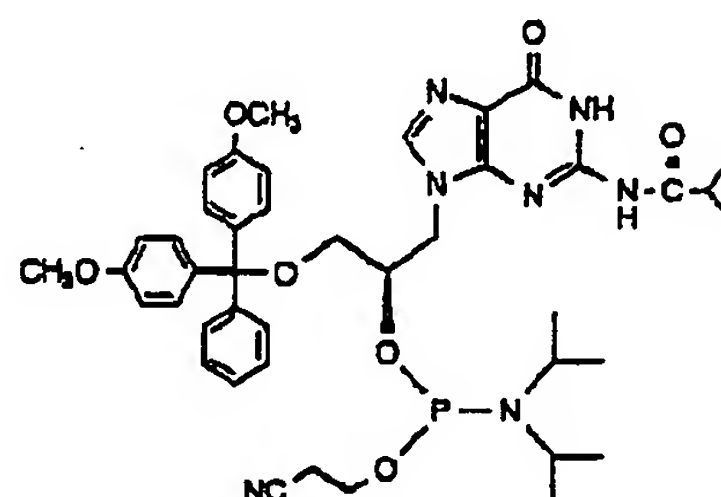
【化18】



【0118】

【化21】

20

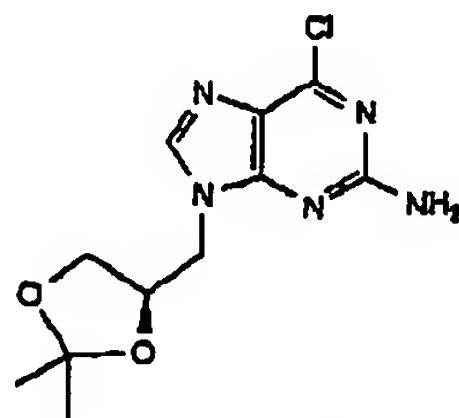


【0110】(R) - (-) - (2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-イル) メタン (和光純薬) を用いて、実施例1 (1a) と同様にして合成した。

【0111】(7b)

【0112】

【化19】

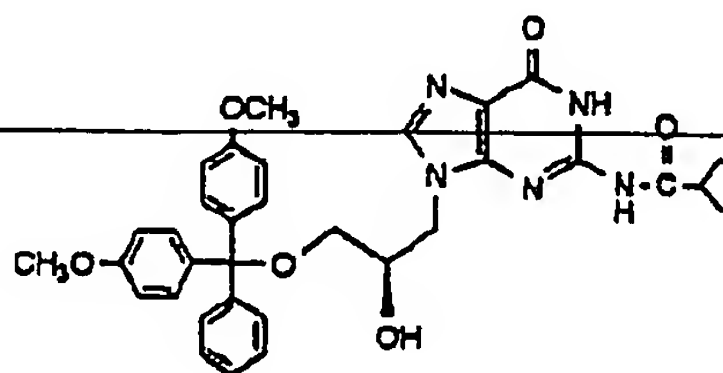


【0113】7aで得られた化合物を用いて、実施例1 (1b) と同様にして合成した。

【0114】(7c)

【0115】

【化20】



【0116】7bで得られた化合物を用いて、実施例1

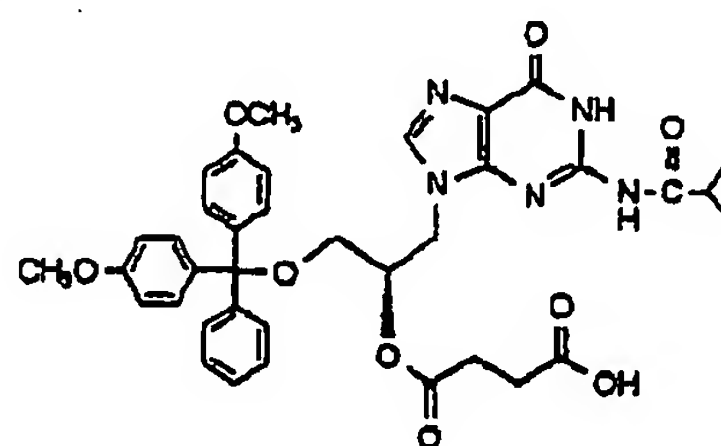
【0119】7cで得られた化合物を用いて、実施例1 (1d) と同様にして合成した。

【0120】(7e)

【0121】

【化22】

30



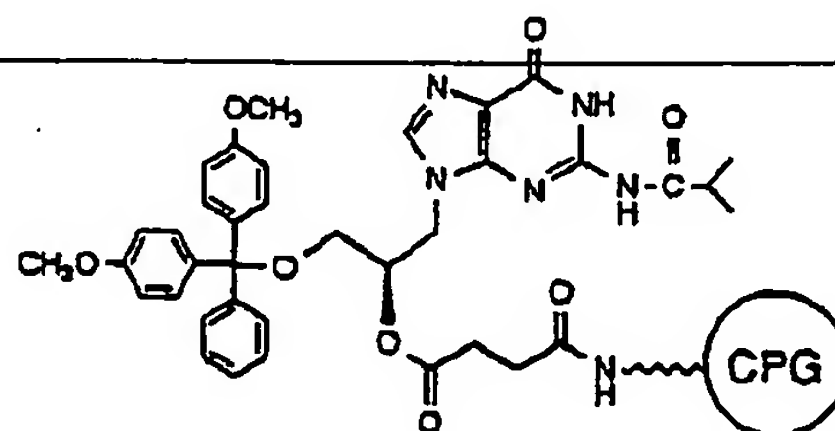
【0122】7cで得られた化合物を用いて、実施例1 (1e) と同様にして合成した。

【0123】(7f)

【0124】

【化23】

40



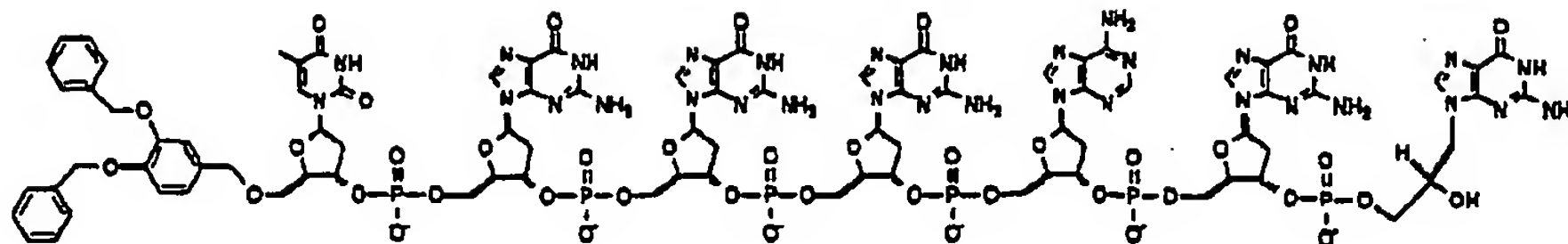


【0126】 (7g)

\* 【化24】

【0127】

\*



【0128】 (7d) で得られた化合物及び (7f) で得られた化合物を、(1d) で得られた化合物及び (1f) で得られた化合物のかわりに用いて、実施例1 (1g) と同様にして合成し、アモルファス状の標記目的化合物を64units (A260) 得た。

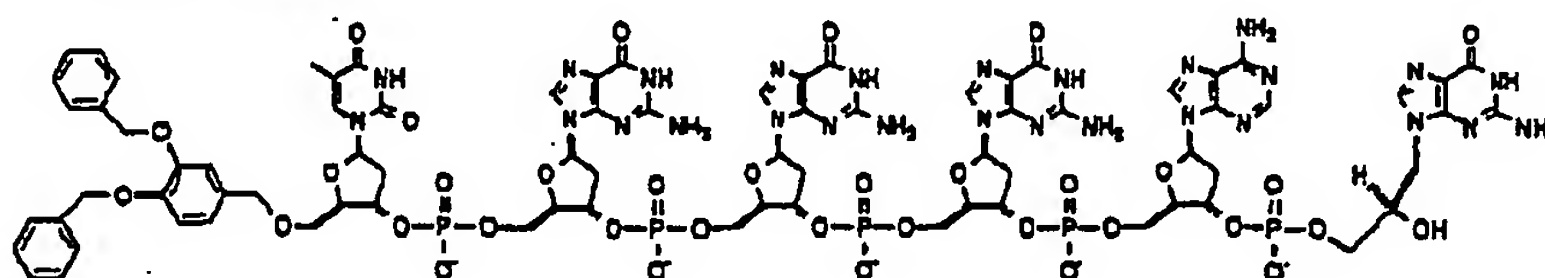
※ 【0129】 UVmax: 253nm

(実施例8)

【0130】

【化25】

※



【0131】 実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGACという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を68units (A260) 得た。

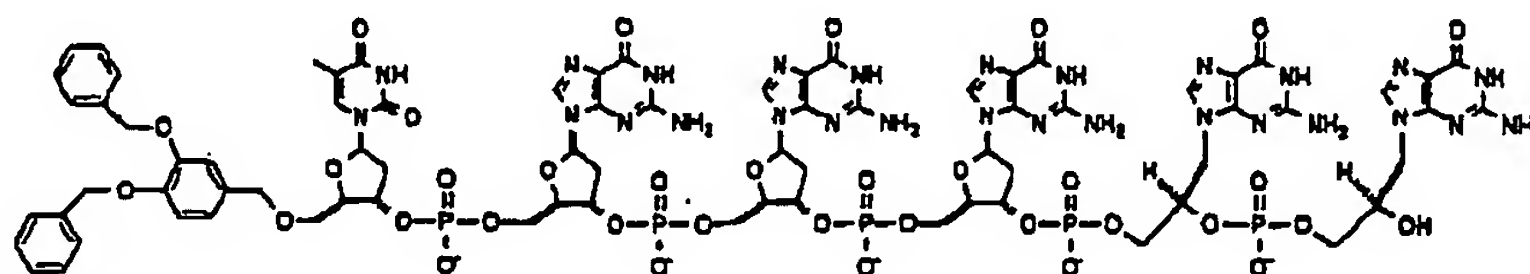
★ 【0132】 UVmax: 255nm

(実施例9)

【0133】

【化26】

★



【0134】 実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を54units (A260) 得た。

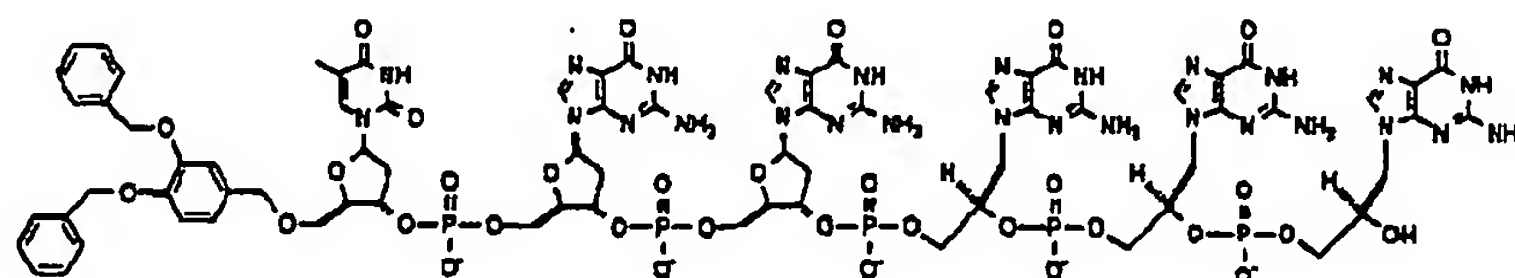
☆ 【0135】 UVmax: 252nm

(実施例10)

【0136】

【化27】

☆



【0137】 実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を48units (A260) 得た。

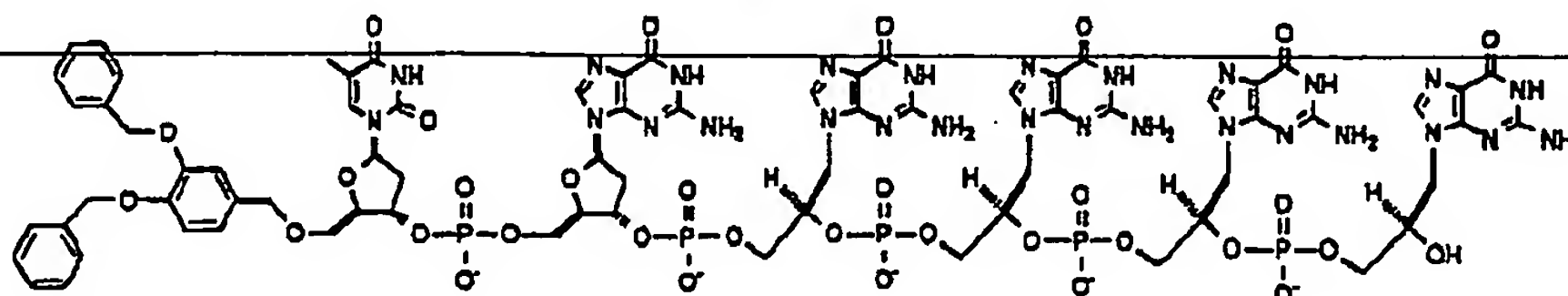
◆ 【0138】 UVmax: 252nm

(実施例11)

【0139】

【化28】

◆





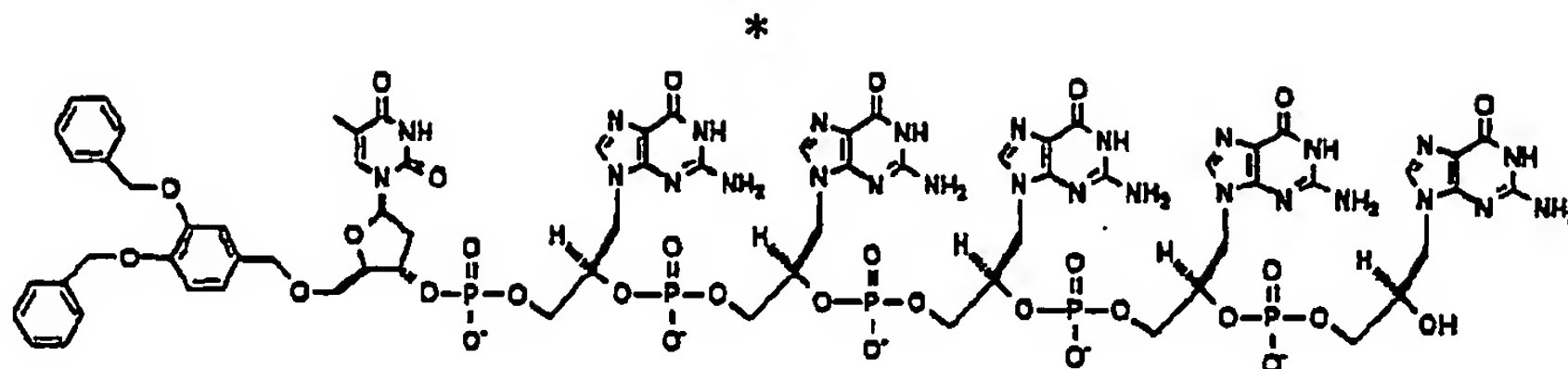
260) 得た。

【0141】UVmax: 252 nm

(実施例12)

\* 【0142】

【化29】



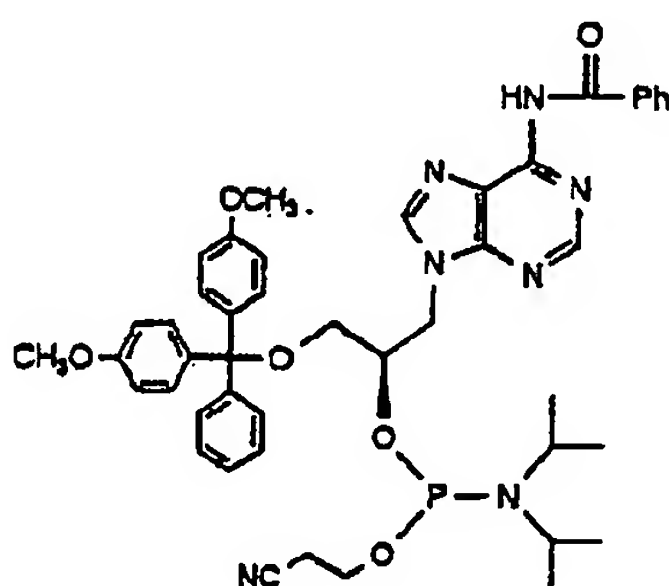
【0143】実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTCCCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を83 units (A 260) 得た。

【0144】UVmax: 252 nm

(実施例13)

【0145】

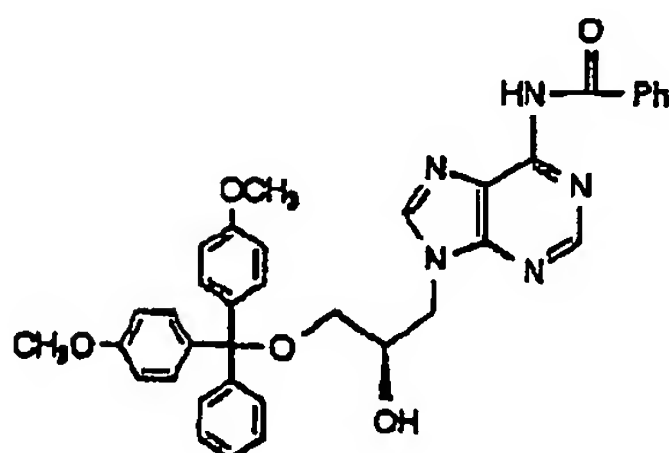
【化30】



【0146】(13a)

【0147】

【化31】



【0148】9-(R)-(2,3-ジヒドロキシプロ

ピル) アデニン (A. Holy, Collection Czechoslov. Chem. Commun., 40, 187 (1975).) 496 mg (2.37 mmol) をピリジンで共沸して乾燥させた後に、25 mL のピリジンに溶解した。1.6 mL のトリメチルシリルクロリドを加えて室温で30分間攪拌した後に、1.5 mL の塩化ベンゾイルを加え、室温で一晩攪拌した。反応容器を氷水浴中で冷却しながら5 mL の水を加えて15分間攪拌した後に、5 mL の29%アンモニア水を加えて1時間攪拌した。溶媒を減圧下に留去した後に、残渣を25 mL のH<sub>2</sub>Oに溶かし、20 mL のジエチルエ

10 塩化メチレンでトリチュレートし、2.545 g の粗結晶を得た。これをピリジンで共沸して乾燥させた後に、50 mL のピリジンに溶かし、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド813 mg (2.4 mmol) を加えて室温で18時間攪拌した。813 mg の4,4'-ジメトキシトリチルクロリドを追加した後に、さらに6時間攪拌した。1 mL のH<sub>2</sub>Oを加えて反応を停止させ、200 mL のクロロホルムで希釈した後に、200 mL ずつの5% NaHCO<sub>3</sub> 水で2回洗浄した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した後に溶媒を減圧下留去し、残渣を100 g (70-230 mesh) のシリカゲルカラムにアプライし、0~3% メタノール-塩化メチレンで溶出することにより、980.3 mg (67%) の目的物を得た。

20

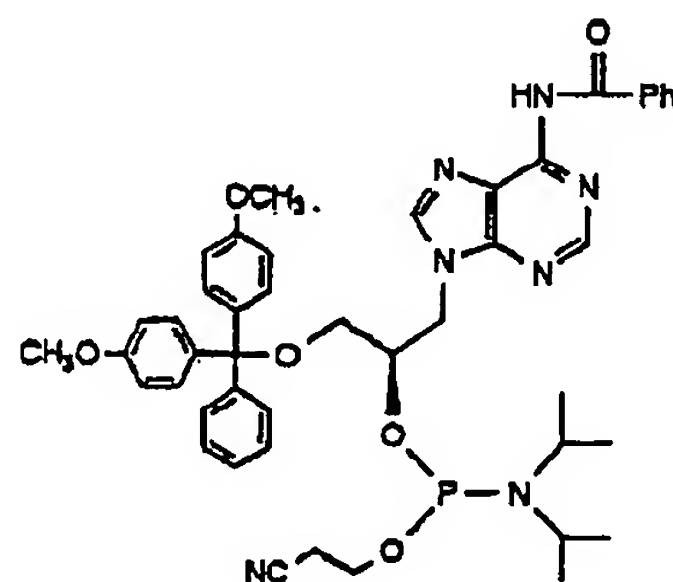
【0149】<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.14 (s, 1H); 8.74 (s, 1H); 8.06-6.80 (m, 19H); 4.52-4.15 (m, 3H); 3.78 (s, 6H); 3.25-3.12 (m, 2H).

(13b)

【0150】

【化32】

30



【0151】(13a) で得られた化合物123 mg (0.2 mmol) をピリジンで共沸して乾燥させた後に、1 mL のテトラヒドロフランに溶かし、ジイソプロピルエチルアミン140 μL と2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト70 μL を加え、室温で攪拌した。1時間後に溶媒を留去し、残渣を50 mL の酢酸エチルに溶かし、50 mL ずつの10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水で2回洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。減圧下に溶媒を留去した後に、残渣を40 g (70-230 mesh) のシリカゲルカラムにアプライし、

40

【0152】<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.07, 9.06 (2s, 1H); 8.80, 8.79 (2s, 1H); 8.08-6.79 (m, 19H); 4.63-4.30 (m, 3H); 3.79 (s, 3H); 3.78 (s, 3H); 3.72-3.40 (m, 4H); 3.33-3.12 (m, 2H); 2.51-2.36 (m, 2H); 1.12-0.97 (m, 12H).

【0153】

【製剤例】

（製剤例1）（ハードカプセル剤）

標準二分式ハードゼラチンカプセルの各々に、100 mgの粉末状の実施例化合物1、150 mgのラクトース、50 mgのセルロース及び6 mgのステアリン酸マグネシウムを充填することにより、単位カプセルを製造し、洗浄後、乾燥する。

【0154】（製剤例2）（ソフトカプセル剤）

消化性油状物、例えば、大豆油、綿実油又はオリーブ油中に入れた、実施例化合物1の混合物を調製し、正置換ポンプでゼラチン中に注入して、100 mgの活性成分を含有するソフトカプセルを得、洗浄後、乾燥する。

【0155】（製剤例3）（錠剤）

常法に従って、100 mgの実施例化合物1、0.2 mgのコロイド性二酸化珪素、5mgのステアリン酸マグネシウム、275 mgの微結晶性セルロース、11 mgのデンプン及び98.8 mgのラクトースを用いて製造する。

【0156】尚、所望により、剤皮を塗布する。

【0157】（製剤例4）（注射剤）

1.5重量%の実施例化合物1、10容量%のプロピレングリコール中で攪拌し、次いで、注射用水で一定容量にした後、滅菌して製造する。

【0158】（製剤例5）（懸濁剤）

5 ml中に、100 mgの微粉化した実施例化合物1、100 mg \* 30

\* のナトリウムカルボキシメチルセルロース、5 mgの安息香酸ナトリウム、1.0 gのソルビトール溶液（日本薬局方）及び0.025 mlのパニリンを含有するように製造する。

【0159】

【試験例】

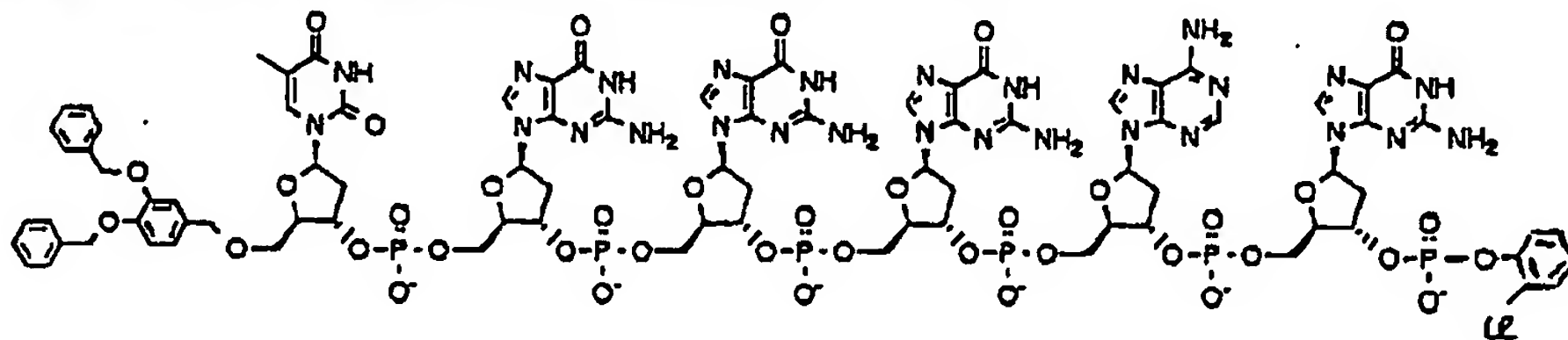
（試験例1）安定性試験

血液は、ヘパリン存在下、SD系雄性ラット腹部大動脈より採取した。採取後、速やかに4℃、3,000 rpm、15分間遠心分離して血漿を得た。得られた血漿1.4 mL添加し、37℃で4分間ブレインキュベートした後、濃度300 μg/mLの各基質を100 μL添加し、37℃でインキュベートしながら経時的に100 μLをサンプリングした。この時、1サンプル当たりの血漿及び基質濃度は、それぞれ93.3%及び20 μg/mLとなっている。

【0160】得られたサンプル100 μLに、ライシスバッファー100 μL、等張リン酸塩緩衝液（pH 7.4、PBS）70 μL、200 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8）10 μL、プロテイナーゼK（25 mg/mL）10 μL、液クロ定量のための内部標準物質（下記化35に示す、200 μg/mL）10 μLを添加し、60℃、30分間加温した。室温まで冷却した後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液（25/24/1）300 μLで2回抽出した。さらに上清の水層にクロロホルム300 μLを添加し、余分なフェノールを除去した。上清の水層をHPLCにて分析した。

【0161】

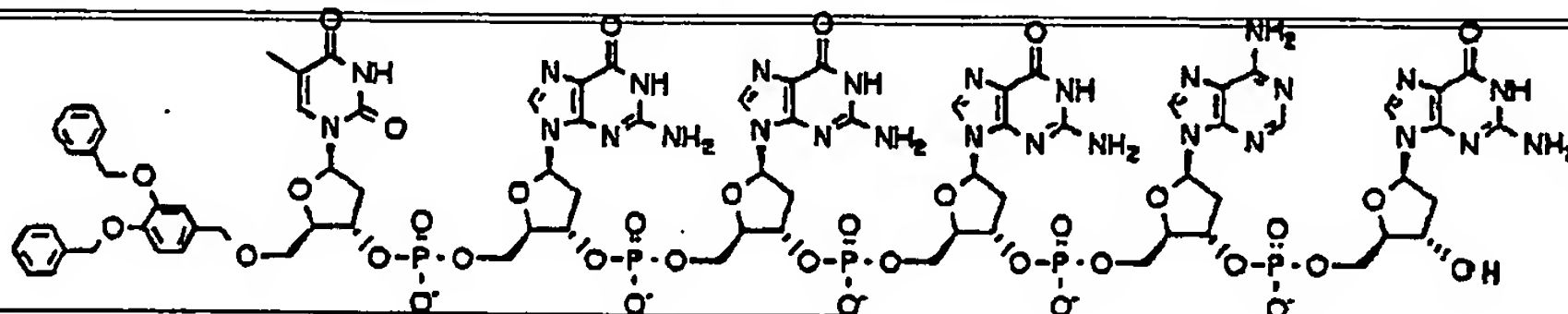
【化33】



【0162】なお、対照化合物として、下記に示す化合物a（特願平6-9772号）を用いた。

※【0163】

※【化34】



【0164】HPLC条件は以下の通りである。

【0165】装置：島津LC-10A

カラム：Wakopak-WS-DNA（4.6 x 150 mm）

溶媒：0.1 M トリエチルアミン-酢酸塩緩衝液（pH 7）：アセトニトリル = 74：26

感度：0.005～0.01 AUFS

注入量：10～20 μL

【表1】

実施例	溶液中の残存量（0分を100とした相対比）		
	5分	30分	1時間
2	92.89±1.26*	80.96±1.83	79.19±2.64
3	99.41±2.54	97.57±1.58	129.11±26.41
6	98.16±1.24	92.92±9.37	109.66±15.63
8	96.75±2.84	83.33±1.68	73.91±1.94
9	99.16±7.91	103.60±6.49	127.24±28.87
12	100.45±2.70	102.72±6.67	102.90±17.17
化合物a	52.29±3.24	5.79±1.77	2.93±1.52

\* n = 3

本発明の化合物は、血漿中での高い安定性を示した。

【0167】（試験例2）修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドの抗HIV-1 活性の測定

抗HIV-1 活性はパウエルらの方法によって測定した（R. Pauel et al., J. Virological Methods 20, 309-321(1988)）。すなわち、対数増殖期にあるMT-4細胞を150×gで5分間遠心し、得られた細胞沈澱を培地にて懸濁したのちHIV-1（IIIB型）を10CCID<sub>50</sub>の濃度で37℃で1時間感染させた。その後、牛胎児血清10%を含むRPMI-1640培地（以下「血清培地」と称する）で遠心し、洗浄することによりHIV-1感染MT-4細胞を得た。

【0168】HIV-1感染MT-4細胞およびHIV-1非感染MT-4細胞をそれぞれ4×10<sup>5</sup>細胞/mlになるように血清培地に懸濁した。96穴プラスチックマイクロタイタープレート中にあらかじめ段階希釈した検体化合物溶液（血清培地に溶解したもの）を各穴に100μlづつ入れ、次いでこの各穴に上記細胞懸濁液を各々100μlづつ添加し、5%の炭酸ガス存在下で6日間静置培養した。

【0169】同様に、検体化合物添加のHIV-1感染MT-4細胞および検体化合物無添加のHIV-1非感染MT-4細胞を培養した。

【0170】培養終了後、MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)法に基づき、生細胞数を測定し(L.M.Green et al., J. Immunol. Methods, 70, 257-268(1984))、HIV-1による細胞障害活性を求めた。検体化合物無添加のHIV-1感染MT-4細胞の細胞障害活性を100%とし、検体化合物無添加のHIV-1(II

IB型)非感染MT-4細胞の細胞障害活性を0%として、HIV-1感染MT-4細胞の細胞障害活性を50%抑制しうる検体の濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた。また、検体化合物の細胞毒性活性として、HIV-1非感染MT-4細胞の増殖を50%抑制する濃度(CC<sub>50</sub>)を求めた。これらの測定結果を表2に示す。

【0171】

【表2】

実施例	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	CC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	5.3	>50
2	1.2	>50
3	1.0	>50
5	9.1	>50
7	3.8	>50
8	2.0	>50
9	4.3	>50
11	4.3	>50

その結果、表2にあげた修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドはいずれも、特に高い抗HIV-1活性を有することが明らかとなった。

【0172】これらの化合物はいずれも10μg/ml以下の濃度で抗HIV-1活性を示した。

(72)発明者 安部 康司  
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株  
式会社内

(72)発明者 金子 正勝  
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株  
式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**